

AG

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公表

## ⑫ 公表特許公報(A)

平5-504579

⑬ 公表 平成5年(1993)7月15日

⑭ Int. Cl.<sup>3</sup>

識別記号

庁内整理番号

審査請求 未請求

予備審査請求 未請求

部門(区分) 3(2)

C 07 K 15/14  
A 61 K 39/395

B

7731-4H  
8413-4C  
8931-4B

C 12 N 15/00

A※

(全 14 頁)

⑮ 発明の名称 精製イムノグロブリン

⑯ 特 願 平3-516509

⑰ 出 願 平3(1991)10月17日

⑱ 翻訳文提出日 平4(1992)6月17日

⑲ 国際出願 PCT/GB91/01816

⑳ 国際公開番号 WO92/07084

㉑ 国際公開日 平4(1992)4月30日

優先権主張 ㉒ 1990年10月17日 ㉓ イギリス(GB) ㉔ 9022547.5

⑮ 発 明 者 ラマゲ、ポール・イアン・ニコ スイス国、バーゼル・ラント、4153 ライナツハ、シエルテンシュ  
ラス⑯ 出 願 人 ザ・ウエルカム・ファウンダー イギリス国、エヌダブリュ1・2ビービー、ロンドン、ユースト  
ジョン・リミテッド シン・ロード 160、ユニコーン・ハウス

⑰ 代 理 人 弁理士 鈴江 武彦 外3名

⑱ 指 定 国 AT, A T(広域特許), AU, BE(広域特許), CA, CH, CH(広域特許), DE(広域特許), DK(広域特  
許), ES, ES(広域特許), FI, FR(広域特許), GB, GB(広域特許), GR(広域特許), HU, IT(広域  
特許), JP, KR, LU, LU(広域特許), NL(広域特許), SE(広域特許), US

最終頁に続く

## 請求の範囲

1. サイズ排除クロマトグラフィーにおいて、非還元状態でシングルピーク、及び還元状態で2つのメジャーピークを示す抗-C D W 5 2 抗体の精製された製剤。
2. 従来の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、非還元サンプルを用いた場合に1つのメインバンド、還元サンプルを用いた場合に2つのメインバンドを示す請求項1記載の精製された製剤。
3. 逆相 H P L C において、非還元状態でシングルピーク、還元状態で2つのメジャーピークを示す請求項1又は2記載の精製された製剤。
4. 0. 8 キロユニット/mg を越える特異的活性を有する抗-C D W 5 2 抗体の精製された製剤。
5. 実質的に宿主細胞の汚染及び/又は凝集が回避された抗-C D W 5 2 抗体の精製された製剤。
6. 前記抗体が変形抗体である請求項1ないし5のいずれか1項記載の精製された製剤。
7. 前記抗体が C D R 移植抗体である請求項1ないし6のいずれか1項記載の精製された製剤。
8. 抗-C D W 5 2 抗体の調製方法であって、
  - a) 抗体をカラムに吸収させるために、抗体の水溶液をプロテインAカラムにかけ、次いで酸性溶液を用いて抗体を溶出させることと、
  - b) 抗体を吸収させるために、前記酸溶出液を荷電粒子のイオン交換カラムにかけ、次いで反対荷電イオンの水性溶液を

用いて抗体を溶出させることと、

c) 多孔性粒子中に非抗体分子を残し、カラムから生じた選択されたフラクション中に所望の抗体を得るために、水溶性溶出液を多孔性粒子のサイズ排除カラムにかけ、溶出液を具備する方法。

9. プロテインAカラムが酸性pHで溶出される請求項8記載の方法。

10. プロテインAカラムがクエン酸で溶出される請求項8又は9記載の方法。

11. プロテインAカラムがプロテインAセファロースである請求項8ないし10のいずれか1項記載の方法。

12. イオン交換カラムが陽イオン交換カラムである請求項8記載の方法。

13. イオン交換カラムが陰イオン交換カラムである請求項8記載の方法。

14. 請求項1ないし7いずれか1項記載の抗-C D W 5 2 抗体の精製された製剤及び生理学的に許容できる希釈剤又は担体を含有する処方。

15. 治療に用いるための請求項1ないし7いずれか1項記載の抗-C D W 5 2 抗体の精製された製剤。

## 明細書

## 精製イムノグロブリン

本発明は、CD<sub>5</sub> 2に対する精製されたモノクローナル抗体の精製された製剤、治療における使用及び製造方法に関する。

抗体またはイムノグロブリンは、蛋白様の二官能分子である。異なる抗体間でかなり変化する領域は、抗原、例えば身体が遭遇する多くの異なる病原菌に結合する。一方、定常領域は、細胞のFc受容体に結合し、また補体を活性化させる。このように、抗体は、外来微生物及びウイルスを破壊する哺乳動物の免疫応答の生体成分を表している。抗原を用いて動物を免疫処置すると、ポリクローナル抗体、すなわち異なる特異性及び親和性を有する異なる抗体が生産される。治療学的な応用については、単一のリンパ球クローンから抗体を生産できることが有利である。このような抗体はモノクローナル抗体と呼ばれ、抗原の特定の決定基に対して特異的である。これらはコーラー及びミルシュタイン (Kohler and Milstein, Nature, 1975, 256, 495-497) の方法によって得ることができる。

IgGクラスの1つの抗体分子は、2つの軽鎖及び2つの重鎖から構成され、これらは互いに鎖間のジスルフィド結合で結合している。各軽鎖は1つの重鎖にジスルフィド結合で結合しており、2つの重鎖は互いにジスルフィド結合で結合している。各重鎖は一方の末端に可変ドメイン、及びそれに続く多数の定常ドメインを有し、各軽鎖は一方の末端に可変

ドメインを、他方の末端に定常ドメインを有する。軽鎖の可変ドメインは重鎖の可変ドメインと並んでいる。軽鎖の定常ドメインは、重鎖の一番目の定常ドメインと並んでいる。重鎖の残りの定常ドメインは互いに並んでおり、ポリペプチド鎖の限定的な切断の後、Fc断片を形成する。

軽鎖及び重鎖の各対の可変ドメインは抗原結合部位を形成する。重鎖の一番目の定常ドメイン及び軽鎖の定常ドメインは、ポリペプチド鎖の限定的な切断の後、共にFab断片を形成する。軽鎖及び重鎖の各対の可変ドメインは、3つの相補性決定領域(CDRs)によって連結された、その配列が比較的保存されている4つのフレームワーク領域を具備した各ドメインで等しい一般構造を有している。4つのフレームワーク領域はほとんどβ-シート構造に結合するループを形成し、CDRsはβ-シート構造に結合するループを形成し、またある場合にはその一部を含有する。CDRsはフレームワーク領域によって非常に近接して結合されており、他のドメインからのCDRsと共に抗原結合部位の形成に寄与している。

抗原CD<sub>5</sub> 2 (G. Hale et al, Tissue Antigens 1990 35, pp 118-127) は、全てではないにしても、ほとんどのヒトリンパ球に広く分布する豊富な分子である。また多数の悪性リンパ球表面にも存在しているが、造血細胞、或いは顆粒球、血小板、赤血球または骨髄細胞には存在しない。多くの異なるアイソタイプのモノクローナル抗体がこの抗原に対して生じ、文献に報告されている (G. Hale et al, Tissue Antigens

1990 35, pp 118-127)。これらの抗体の1つであるIgG 1抗体はヒト化されている (Nature, 1988, 322, 323-327及びEP03 28404)。この抗体はカムパス (Campath) 1Hとして知られている (カムパスはウエルカムファウンデーション社の商標である)。この抗体の製剤は非ホジキンリンパ腫にかかっている患者を治療するために用いられている (G. Hale et al, Lancet, 1988, pp 1394-1399)。

カムパス1Hは、本来プロテインAセファロースカラム (EP03 28404) 上で1段階工程で精製された。プロテインAはイムノグロブリンのFc領域に結合する官能基特異性リガンドである。従って、培養培地中に存在する血清に含まれる他のイムノグロブリンも、目的のイムノグロブリンと共に精製されてしまい、これにより最終生成物が汚染される (P. A. Underwood et al, Meths. in Enzymol, 121 pp 301-306 (1986) 及び P. A. Underwood et al, J. Immunol. Meths 60, 33, 1983)。医学的治療における使用が意図された抗体は、繰り返し投与されることが必要かもしれないので、投与すると免疫応答を引き起こし、腎毒性、血清病及びある場合にはアナフィラキシーショックを誘導し得るような外来イムノグロブリンを除去する必要がある。全動物血清或いは血清アルブミンは他の蛋白質、脂質及び炭化水素を含有する。これらの分子はそれ自身でも免疫応答を引き起こし得るが、ウシ海綿状脳障害 (BSE) を引き起こす因子等の病原体を潜伏させる危険性があるように見える。エンドトキシンもまた存在し、潜在的に致命的な免疫応答を引き起こすので望ましくない。

発現した抗体を含む培養培地中の他の汚染物には、宿主細胞及びウイルスの核酸が含まれる。また、抗体の凝集体も同様に免疫原として作用し、所望でない免疫応答を引き起こす。

従って、本発明は、サイズ排除クロマトグラフィーにおいて、非還元状態下ではシングルピークを、変性及び還元状態下では2つのメジャーピークを呈する抗-CD<sub>5</sub> 2抗体の精製された製剤を提供する。

この製剤は、好ましくはまた、通常のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動上において、非還元サンプルを用いると1つのメインバンドを、また還元サンプルを用いると2つのメインバンドを呈する。

更にこの製剤は逆相HPLCにおいて、非還元状態下では鋭いシングルピークを、還元状態下では2つのメジャーピークを呈する。

サイズ排除クロマトグラフィーの名称は、蛋白質の大きさに基づく分離を示唆する。一般に、大きい分子が多孔性固定相に入らずにカラムを通してそのまま運搬される。一方、比較的分子量の小さい分子は連続してますます固定相に入り得る結果として特に長い溶出時間を有するときに、分離が生じる。従って固定相の多孔性度は、達成される分離を決定するものである。この分析技術は特に、精製された製剤における凝集レベルを測定するのに好ましい。固定相はジオール基で修飾され得る広孔シリカゲルであり、好ましくはゾルバックス (Zorbax) GF450-GF250 (デュポン社の商標) 或いはTSKゲルG3000SWXL又はG4000SWX

L等のゲルである。移動相のpH領域は、一般にpH4~8の範囲、好ましくは6~7.5、最も有益にはpH6.8付近である。この相は、有益にはオルトリン酸水素二ナトリウム等のリン酸塩及び硫酸ナトリウム又は硫酸カリウム等の硫酸塩、及び水の混合物である。このような混合物のモル濃度は一般に25mMないし1M、好ましくは50mMである。

SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS PAGE)は混合物中に存在する蛋白質の数及び型についての情報、それらの相対的存在度、及び分子量測定を与えるものである。SDSはアニオン界面活性剤であり、電気泳動の前に蛋白質と反応する。ほとんどの蛋白質SDS複合体は可溶性であり、電荷の影響の下でポリアクリルアミドゲルを通して陽極に移行する。移動率は、一般に蛋白質の分子量の対数に反比例する。平台型或いは垂直平板又は棒状の濃度勾配ゲル上で、SDS分析を遂行することが便利である。濃度勾配は、10~22%が有益であり、より好ましくは8~18%である。ゲルは好ましくはファーマシアエクセル(Pharmacia Excel)(商標)ゲルである。

逆相HPLCは疎水性に基づいて分離するものである。他のHPLCと同様に、ポリマー固定相、例えばポリスチレン/ジビニルベンゼンの固定相が存在する。移動相は、通常は水溶性緩衝液又は希釈酸と、水混和性有機溶媒(a water miscible organic solvent)との組み合わせである。蛋白質を効果的に分離するために、移動相は一般に濃度勾配システムであり、分離を達成することが要求され、好ましくは便宜の

ため直線状である。

イムノグロブリンの分析に対する固定相は、ポリマーラビズPLRP-S(Polymer Labs)等のような、一般に分子サイズ約8 $\mu$ Mの有機ポリマーマトリックスでもよい。孔のサイズは、好ましくは300Å又は1000Åである。移動相は有益には酢酸、酢酸又はトリフルオロ酢酸等の酸、水及びアセトニトリルの混合物である。酸及び水は、好ましくは5:3の比率で存在する。

抗体は、変性状態下で、例えば塩化グアニジウム及びジチオトレイノールを用いてジスルフィド結合を還元することにより、その成分である重鎖及び軽鎖に還元され得る。その後例えばヨードアセトアミド、ヨード酢酸を用いて遊離チオール基をアルキル化し、これは結合が再び形成されるのを防ぐのを助ける。

精度の測定は、抗体製剤の特異活性によって提供される。特異活性は、例に示した方法で測定される。本発明の製剤は、好ましくは0.8キロユニット/mg、理想的には0.9キロユニット/mg、最も好ましくは約1.0キロユニット/mgを超える特異活性を有する。

本発明の抗-CDW52抗体の精製された製剤は、理想的には宿主細胞蛋白質、核酸及びエンドトキシン等の宿主細胞汚染物から実質的に分離されている。特異活性は、製剤中の宿主細胞蛋白質のレベルについての情報を提供する。エンドトキシンのレベルはParenteral Quality Control M.J. Alles et al.; Marcel Dekker Inc., New Yorkに記載されたLAL

(Limulus Amoebocyte Lysate)法によって測定することができる。

本発明の製剤はまた、サイズ排除クロマトグラフィーで測定されるように、凝集物からも実質的に分離されている。これらのレベルは2%未満であることが望ましく、理想的には0.5%未満である。

本発明の抗体は組換え発現システムを用いて調製することができ、好ましいシステムは、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞を用いた哺乳動物発現システムである。これらはジヒドロ葉酸レダクターゼ(dhfr)が欠損しており、従って成長はチミジン及びヒポキサンチン依存性である(PNAS 77 1980, 4216-4220)。雑種dhfr<sup>-</sup> CHO細胞株は、dhfr陽性表現型のCHO細胞トランスフォーマントの選択を可能にする抗体遺伝子及びdhfr遺伝子がトランスフェクトされている。選択は、チミジン及びヒポキサンチンの欠如した培地上のクローンを培養することによって遂行される。チミジン及びヒポキサンチンが欠如すると、癌化していない細胞の成長は阻止され、また癌化した細胞が葉酸経路をリサルベージし、これにより選択システムを回避するのを防止される。これらのトランスフォーマントは通常、両方のトランスフェクトされた遺伝子が共に組み込まれているため、所期生成物の遺伝子を低レベルで発現する。抗体遺伝子の発現レベルは、メソトレキセート(MTX)を用いて増幅することにより増加させてもよい。この薬物はdhfr酵素の直接的な抑制因子であり、これらの条件下で生存するに十分なまで

に、そのdhfr遺伝子コピー数を増幅する耐性コロニーの単離を可能にする。dhfr及び抗原遺伝子は、原トランスフォーマントでかなり近接して結合しているため、通常並行増幅で所望の抗原遺伝子の発現を増加させる。

CHO或いはミエローマ細胞を使用する他の発現システムは、WO87/04462に記載されたグルタミンシンセターゼ(GS)増幅システムである。このシステムは、GS酵素をコードする遺伝子及び所望の抗原遺伝子を細胞にトランスフェクトすることを包含する。無グルタミン培地で増殖した細胞がその後を選択される。これらの選択されたクローンは、その後メチオニンスルホキシミン(Msx)を用いてGS酵素を阻害される。細胞は、生存するために抗体をコードする遺伝子の並行増幅でGS遺伝子を増幅させる。

抗体は、好ましくは培養培地に分泌された形で得られる。回収された培地はその後、水性溶液を得るために、限外濾過工程で濾過及び/又は濃縮され、精製手順に供される。この精製手順は、

- 抗体をカラムに吸収させるために、抗体の水性溶液をプロテインAカラムに適用し、次いで酸性溶液を用いて抗体を溶出させることと、
- 抗体をカラムに吸収させるために、酸性溶出液を荷電粒子のイオン交換カラムに適用し、次いで反対荷電イオンの水性溶液を用いて抗体を溶出させることと、
- 分子サイズに従って分離し、カラムから溶出した選択されたフラクションから所望の抗体を得るために、水性溶出液

を多孔性粒子のサイズ排除カラムに適用することを含む。

プロテインAは、ほとんどのIgGのFc領域に結合する官能基特異性リガンドである。いくつかの黄色ブドウ球菌種によって合成され、培養上清から単離し、その後アガロースビーズ又はシリカに結合させることにより不溶化することができる。他の方法は、細菌細胞表面に多量のプロテインAを有する種的全細菌を用いることである。両タイプのカラムは商業的に入手可能である(プロテインA-ファーマシア、Whole Bacteria Calbiochem, IgG sorb)。 (Alan Johnstone and Robin Thorpe Immunochromatography in practice, Blackwell Scientific Publications, Chpt. 10)。プロテインAの他にプロテインGも用いることができる (Analytical Chem. Vol. 61 (13) 1989 1317)。

最も好ましく用いられるカラムはプロテインAセファロースカラムであり、特にプロテインAセファロースファーストフロー (Protein A Sepharose Fast Flow) (商標) が好ましい。理想的には、カラムは約pH 7.0のトリス又はリン酸緩衝生理食塩水で洗浄され、抗体は例えば濃度約0.1Mのクエン酸等の酸を用いて、酸性pH 3.0~3.5、有益にはpH 3.0で溶出される。

イオン交換クロマトグラフィーは、固定相の荷電基及び移動相のサンプル間の相互作用を利用している。イオン交換カラムの固定相は陽性に荷電した陽イオン交換体、或いは陰性に荷電した陰イオン交換体である。荷電基は、移動相中の逆

に荷電した対イオンによって中和され、この対イオンはクロマトグラフィーの間に、もっと高く荷電したサンプル分子に置きかわる。例えばアガロースを基礎にした架橋カラム、例えばS-セファロースファーストフロー (商標) 陽イオン交換カラム、特にS-セファロースファーストフロー陽イオン交換 (商標) を用いることが好ましい。また、膜を基礎にしたカラムを使用することもできる。カラムは通常、プロテインAカラムからの溶出液を適用した後、20mM HEPES緩衝液 (pH 7.5) を用いて洗浄され、抗体は0.2M~0.075Mの範囲の塩化ナトリウムを含有する同緩衝液を用いて溶出される。

サイズ排除クロマトグラフィーは、その名の通り蛋白質の大きさに基づく分離を示唆する。一般に、大きい分子が多孔固定相に入らずにカラムを通してそのまま運搬される一方、比較的小さい分子は連続してますます固定相に入り得る結果として特に長い溶出時間を有するときに、分離が生じる。従って固定相の多孔性は、達成される分離を決定するものである。好ましい材料は化学的に結合しており、圧縮に耐性なものであり、スーパーデックス (商標) 等のアガロース及び/又はデキストラン組成物である。好ましいカラムは、スーパーデックス200サイズ排除媒体である。イオン交換カラムからの溶出液は好ましくはスーパーデックスカラムに適用され、pH 5~8の緩衝液、好ましくはpH 7.2のPBS中で展開される。

各カラムは、好ましくはフィルターによって保護されてお

り、これは0.2µmゲルマンアクロ無菌フィルターであってもよい。或いは、プロテインAカラムの場合はバルポジオン (PALL posidyne) SLK 7002 NE2P またはバルDSLK 2フィルター (バルプロセスフィルトレーション社、ヨーロッパンハウス、ハーベストストリート、ボーツマス 301 3PDより入手可能) によって、また他の2つのカラムの場合は、イオン交換カラムについてはミリパック (Millipack) フィルター、好ましくはミリパック100によって、サイズ排除カラムについてはミリパック20または60 (ミリポア、ザンバルード、ブラックモアレーン、ワットフォードヘルツより入手可能) によって保護されてもよい。カラムは好ましくは使用前に、好適な消毒剤、例えばいずれのカラムに対しても0.5M NaOHを用いて16時間、或いはプロテインAカラムに対しては20%エタノール中2%グルコン酸ヒピテン、他の2つのカラムに対しては1N NaOHを用いて消毒される。消毒剤は、蛋白溶液を適用する前に好適な無菌緩衝液を用いて洗浄される。工程に用いられるすべての溶液は、好ましくは無菌でありかつエンドトキシンを含有しないものである。

上記の精製手順に、付加的な工程を加えてもよい。ウイルスの、或いは宿主細胞の核酸汚染物を更に減少させるために、限外濾過を用いてもよい。これは、ビレスルブ (Viresolve) /70Å膜或いはビレスルブ/180Å膜、更にPLMK再生セルロース300kカットオフ膜 (すべてミリポア、ザンバルード、ブラックモアレーン、ワットフォードヘルツ

より入手可能) 等の商業的に入手可能な限外濾過ユニットを用いて遂行することができる。ウイルス汚染物を減少させる他の方法はカートリッジ型のナイロン膜、例えばバル (PALL) のナイロン66、0.04M膜を用いた微細濾過 (microfiltration) である。

汚染DNAを除去する精製工程、例えば中性pHの緩衝液、好ましくはpH 7.2のPBS中で、1M~3Mの範囲のNaClを用いたプロテインAカラムの洗浄を導入してもよい。グリシンを、好ましくはpH 8.8~9.0の範囲で、約1.5MでNaClに添加してもよい。

本発明の抗-CD<sub>52</sub>抗体は、マウス或いはラット由来のハイブリドーマから得たモノクローナル抗体であってもよく、及び/又は組み換えDNA技術を用いて得たモノクローナル抗体であってもよい。

組み換えDNA技術は、2つの基本的な型の変形抗体を開発する能力を提供する。第一の型は、キメラ抗体と呼ばれるもので、げっし類の定常ドメインのみをヒト由来の等価ドメインに置き換えたものである (Morrissey et al, P. N. A. S., 1984, 81, 6851-6855; Boulton et al, Nature, 1985, 314, 268-270; 及びNeuberger et al, Nature, 1985, 314, 268-270)。第二の型は、マウスの定常ドメイン及びマウスのフレームワーク領域を、すべてヒト由来の等価ドメイン及び領域に置き換えたものである。この第二の型の抗体は、ヒト化 (humanize) 抗体或いはCD<sub>52</sub>グラフト抗体と呼ばれる (Jones et al, Nature, 1986, 321, 522-525; 及びRiechmann et al, Nature, 1988

8,332,323-327)。これらの抗体はヒト抗体とかなり共通しており、人間患者に投与したときに、同程度まで抗-抗体応答を引き出すことはない。ヒト抗体もまた使用できる。

従って、本発明の精製された抗-CD<sub>52</sub>抗体は、重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列が、ハイブリドーマを用いてインビトロ或いはインビボでリンパ球種によって生産された抗体の配列と一致する、ラット、マウス或いはヒト抗体であってもよい。好ましくは、抗-CD<sub>52</sub>抗体は、重鎖及び軽鎖が天然の抗体と一致しているが、天然には生じないような方法で結合しているハイブリッド抗体等の変形抗体である。抗体は1つの抗体の可変領域、及び他の抗体の定常領域を有するキメラ抗体であってもよい。従って、キメラ抗体は種/種キメラ或いはクラス/クラスキメラであってもよい。このようなキメラ抗体は抗原結合能力を改良するため、或いはエフェクター機能を変化させるために1或いはそれ以上の修飾を有してもよい。変形抗体の他の型は、複合抗体を含むヒト化或いはCDRグラフト抗体であり、これはCDRに加えて超可変領域の一部がヒトフレームワークに移入されているものである。このような抗体のフレームワーク、或いは定常領域に付加的なアミノ酸を変化させてもよい。従って本発明の範囲には、そのアミノ酸配列が天然に存在するものでないいずれの抗-CD<sub>52</sub>抗体も含まれる。しかし、CDRグラフト抗体の最も好ましい例は、カムバス1H（ウエルカムファウンデーション社の商標）である。カムバス1HのCDRを含む抗体鎖DNA配列はEPO328404に記載されており、

この開示はここで参考に取り込まれている。従って本発明はEPO328404に記載された1或いはそれ以上のCDR配列を有する抗-CD<sub>52</sub>抗体の精製された製剤を包含する。

精製された抗-CD<sub>52</sub>抗体は多くのヒト疾患の治療のため、医学的治療に有用であり、一般的には免疫抑制剤として、特に例えば、重症の脈管炎、慢性関節リウマチ、全身性狼瘡を含むT細胞を介する疾患、多発性硬化症、移植片対宿主疾患、乾癬、若年免疫型糖尿病、シェーグレン疾患、甲状腺疾患、重症筋無力症、移植拒絶及び喘息などの自己免疫疾患に対して有用である。これらの抗体はまた、非ホジキンリンパ腫及び白血病等の癌の治療にも有用である。

従って本発明は、前記疾患のいずれかの治療のための医薬の製造における抗-CD<sub>52</sub>抗体の精製された製剤の使用を提供する。また、人間に対して抗-CD<sub>52</sub>抗体の精製された製剤の治療学的な有効量を投与することを含む、このような疾患のいずれかを有する人間の治療方法も提供される。

このような抗体の投与量は治療される症状及び治療される受容者によって変化するが、成人患者に対して1〜約100mgの範囲、好ましくは1〜10mgで、通常毎日1〜30日間の期間に渡って投与される。2部に分けた投与方法が好ましく、1〜5mgを5〜10日間投与した後、続いて6〜15mgを更に5〜10日間投与する。

また本発明には、抗-CD<sub>52</sub>抗体の精製された製剤を含む処方も含まれる。このような処方は、好ましくは、抗体

に加えて生理学的に許容し得る希釈剤或いは担体を、可能なならば他の抗体、抗生物質等の他の因子と混合して含有する。好適な担体には、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水グルコース及び緩衝生理食塩水が含まれるが、これらに限定されるものではない。また、この抗体は凍結乾燥し、必要ときに、上記の水溶性緩衝液を添加することにより使用のために再構成してもよい。投与ルートは通常は、静脈内、筋肉内、皮下及び腹腔内の注射又は配薬（delivery）を含む経口的なものである。

添付図面は以下の通りである。

図1

(a) クリップされた（crippled）dhfr選択増幅マーカー及びカムバス1H軽鎖cDNAに対する発現カセットを含むpLD9構造。点線の矢印を有するスモールボックスは弱められたSV40プロモーターである。矢印を有する比較的大きいドットの付いたボックスはβアクチンプロモーターである。ポリAは、ポリアデニル化で作られたものであり、終止シグナルに対応している。oriを有するスモールボックスはSV40の複製起点である。

(b) ネオマイシン選択マーカー及びカムバス1H重鎖cDNAに対する発現カセットを含むpNH316構造。矢印を有するボックス及びMTはマウスメタロチオネインプロモーターである。示された制限酵素切断部位は、HがHindIII、BgがBgIII、BがBamHI、R1がEcoRIである。

図2

1本のメインバンドを示している還元されていない及び還元されたカムバス1HのSDSポリアクリルアミドゲル。

図3

シングルピークを示している還元されていないカムバス1Hの逆相高速クロマトグラフ。

図4

抗体の重鎖及び軽鎖に一致した2つの分解ピークを示している還元された及びカルボキシメチル化されたカムバス1Hの逆相高速クロマトグラフ。

図5

シングルピークを示している還元されていないカムバス1Hの高速サイズ排除クロマトグラフ。

図6

2つのメジャーピークを示している還元されたカムバス1Hの高速サイズ排除クロマトグラフ。

例1

#### C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O細胞からのカムバス1Hの生成

例1A：カムバス1Hに対する重鎖及び軽鎖cDNAのクローニング

ラットカムバス-1Gモノクローナルの相補性決定基を、ヒト染色体重鎖及び軽鎖フレームワークに直接グラフトした（Winter et al, Nature, 1988, 322, 323-327）。これらの構造は、発現させるためにミエローマ細胞株Y0に組み込み、その結果、10〜14日の培養でカムバス1Hの収率は5μg/m

1に及んだ(Hale et al, Tissue Antigens, 1990, 35, 118-127及び Winter et al, Nature, 1988, 322, 323-327)。ミエローマ細胞株TF57 (Hale et al, ibid)を用いて、軽鎖及び重鎖cDNAに対してそれぞれ0.9~1.2Kb及び1.4~1.7Kbの選択された大きさのcDNAフラクションを生成した。これらは $\lambda$ gt10のEcoRIリンカーcDNAライブラリーを作成するために用いられた。すべての手順はHayash et al (DNA Cloning, Vol 1: A Practical Approach, 1984, Glover, D (Editor), IRL Press, Oxford)に記載されている。ライブラリーは、完全な長さのcDNAクローンを単離するために、可変領域に特異的な $[^{32}P]$ ニックトランスレーションプローブを用いてスクリーニングされた。軽鎖cDNAについては、Ba1-31エキソヌクレアーゼを用いて32部位まで5'非翻訳リーダーを除去し、HindIIIリンカーを添加した。3'末端については、停止コドンの47bp上流の単一のSacI部位を用いた。SacI-HindIII合成オリゴヌクレオチド対はこの配列及び停止コドンの直後のHindIII部位を再生成するのに用いられた。重鎖cDNAの5'末端については、ATG開始コドンが重複する単一のNcoI部位は、HindIII-NcoIオリゴヌクレオチド対を用いて、軽鎖のものと同一の29bp非翻訳リーダーを再構成するのに用いられた。3'末端においては停止コドンの12bp下流の単一のNaeI部位をリンカーを用いてHindIII部位に転換した。

#### 例1B: ベクターの構成

ヒト $\beta$ -アクチンプロモーターを、pH $\beta$ APr-3-neo (これは、SV40ポリアデニル化/終止シグナルを個々のヒト $\beta$ -アクチンシグナルで置き換えた以外はpH $\beta$ APr-1-neo (Gunning et al, P. N. A. S., 1987, 84, 483-35)と一致する)から2860bpのPvuII-HindIII断片として切り出した。ここで、PvuII部位はリンカーを用いてBg1II部位に逐次転換された。pH $\beta$ APr-3-neoからヒト $\beta$ -アクチンポリアデニル化及び終止シグナルを単離するために、単一のHindIII部位の下流1.4kbのSphI部位を、リンカーを用いてBamHI部位に変換した。p104と呼ばれる基本dhfrベクターを以下の通り構成した。psV2dhfr中のSV40プロモーター上での128部位におけるSphI部位 (Sobramani et al, Mol. Cell. Biol., 1981, 1, 854-864)をSalI部位に転換し、すべてのエンハンサー因子をプロモーターから除去した。弱められたdhfr発現ユニットを、その後、SalI-BamHI断片としてpsV0d (Mellon et al, Cell, 1981, 27, 279-288)の同一部位にサブクローニングした。pLD9を構成するために、p104ベクターをBamHIで切断し、フォスファターゼ処理し、Bg1II-HindIII $\beta$ -アクチンプロモーター、HindIIIカムバス-HI軽鎖cDNA及びHindIII-BamHI $\beta$ -アクチンポリA/終止シグナルから構成される他の3つの断片とつないだ。pNH316を構成するために、構成物pdB-PV-MMT-neo (Law et al, Mol. Cell. Biol., 1983, 3, 211

0-2115)をBamHIで切断し、フォスファターゼ処理し、アガロースゲル上の分離によってネオマイシン遺伝子を含む断片を単離した。これを2つの $\beta$ -アクチン断片及びカムバス-1H重鎖cDNAにつなげた。構成物pLD99及びpNH316は図1に示されている。

#### 例1C: CHO細胞中のカムバス-1Hの発現

dhfr<sup>-</sup>CHO細胞株DUK-B11 (Villob et al, P. N. A. S., 1980, 77, 4216-4220)を、10%牛胎児血清、及び各4 $\mu$ g/mlのヒポキサンチン及びチミジンで補充したIscove's MEMで成長させた。10 $\mu$ gのpLD9及びpNH316を、カルシウムリン酸法を用いて細胞上に共沈させ (Gordon et al, DNA Cloning, 1985, Vol II, 143-190, Academic Press, N. Y.)、10%透析血清を用いた以外は上記培地と等しい培地を用いることによってdhfr<sup>+</sup>/neoの二重表現型に対して選択し、ヒポキサンチン/チミジンを除去し、G418 (Gibco)を500 $\mu$ g/ml含有させた。いくつかの実験において、MTXはdhfr<sup>+</sup>トランスフォーマントに対する第一ラウンドの選択中に直接含有させた。数百個の耐性コロニーをブールし、培養培地中のカムバス-1H抗体の生成をアッセイした。平均収量は、非増幅第一ラウンドトランスフォーマントについて0.5 $\mu$ g/mlであった。

その後各ブールされた細胞群を10<sup>-7</sup>M MTXの存在下で培養し、2週間後に耐性コロニーを再びブールし、カムバス-1H産生の力価を測定した。80倍に及ぶ多大の収率増

加を示した(表1)。これらの細胞を希釈クローニングし、カムバス-1Hの収率についてスクリーニングし、かなりの高産生株2つを単離し、A37及び3D9と名付けた(表1)。これらを更に10<sup>-6</sup>M MTX存在下で増幅させ、その後希釈クローニングし、上記のようにスクリーニングした。この第二の及び最終の増幅工程における発現の増加は、上記に見られたようにドラマチックではなかった。それでも、コンフレントになるまで再び培養し、更に4日間放置したとき、細胞株A39及び3D11は200 $\mu$ g/mlに及ぶカムバス-1Hを産生できるようになった。

表1

段階的な増幅を用いたカムバス-1Hの発現レベル

構造	選択工程	蓄積したカムバス-1H ( $\mu$ g/ml)
pLD9	dhfr <sup>+</sup> /neo基本ブール	0.5
+pNH316	10 <sup>-7</sup> M MTX 増幅ブール	18-40
	細胞株A37及び3D9	40
	10 <sup>-6</sup> M MTX 増幅ブール	60-90
	細胞株A39	100
	細胞株3D11	150-200

細胞はT-175組織培養フラスコ中でコンフレントに達し、その後新鮮な50ml組織培養培地で再び増殖させ、

更に4日間放置した。この期間内に培地中に蓄積したカムバスー1H抗体をELISAで測定した。アッセイの日の総細胞数は通常 $2.5 \times 10^7$ であった。3D11細胞株からの収率は、 $100 \mu\text{g}/10^6$ 細胞/日の生産率であった。

コトランスフェクションベクターpLD9及びpNH316は、更に上記と異なる他の増殖手法を評価するのに用いられた。dhfr<sup>-</sup>CHO細胞を通常の方法でコトランスフェクトし、2日後に、G418を含有させ、かつMTXの濃度を $3 \times 10^{-9}\text{M} \sim 10^{-7}\text{M}$ の範囲に増加させた一連のフラスコに(ネオマイシン選択のために)直接分配した。2週間の選択の後、耐性コロニーの数をカウントし、各フラスコにブールした。細胞群を安定化させ、カムバス1H抗体力価をアッセイした。その結果を表2に示す。MTXのレベルを増加させると、生存するdhfr<sup>+</sup>コロニーの数は著しく減少するが、これらは相対的にかなりのカムバス1Hを発現した。このように、高濃度MTXにおける1工程の直接的選択においては、基本となるdhfrレベルについて選択された細胞群と比較して、抗体収率を60倍に増加させる細胞群を単離することが可能である。

これらの細胞株及び前記のA39/3D11株の増殖速度は、癌化していない親dhfr<sup>-</sup>CHO細胞よりかなりゆっくりであった。これは、一度生産物遺伝子をかなり多量に発現するように処理されたこれらの細胞の一般的な特徴である。15E10及び4F11細胞株の収率は時間によってかなり変化することがわかり、後者は危機及び死の前に約3週間の限定された継代寿命を有するようである。5E10を含む、二次増殖手順から単離された株は一般に培養するのにかなり変化しやすいが、この不安定性は他の細胞株においては全く見られない。これらの株の中で、3D11は増殖性及び安定性もよく、カムバス1Hを高回収できるものである。これらの特徴の伝播を確認するために、3D11細胞株をもう一度希釈クローニングして3D11<sup>8</sup>株を生じ、これは同様に $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ に及ぶカムバス1Hを生産した。

## 例2

無血清培地中でのC1H 3D11<sup>8</sup>-44の増殖及びこの細胞からの生産

$10\%$  FBSフロー非必須アミノ酸、 $10^{-6}\text{M}$  メソトレキセート及び抗生物質を加えたIscoves中でモノレイヤーとして増殖したC1H 3D11<sup>8</sup>をほぼ90%コンプレントにした。これらの細胞をトリプシン/ベルセン(trypsin)を用いてプラスチックから剥がし、無供給Iscoves培地中で洗浄して遠心し、以下の表に示した0.25%ベプトン、0.1%ポリエチレングリコール(PEG)10、0.00、0.5%牛胎児血清(FBS)を加えた、メソトレキ

表2  
直接的選択を用いたカムバスー1Hの発現レベル

選択 (M MTX)	dhfr <sup>+</sup> コロニー	蓄積したカムバス ー1H ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
MTXなし	500	0.5
$3 \times 10^{-9}$	40	2
$10^{-8}$	5	7
$3 \times 10^{-8}$	5	30
$10^{-7}$	-	-

各MTX選択工程におけるコロニーをブールし、表1の解説に記載したようにアッセイした。

細胞の他のコトランスフェクションに続いてこの選択手順を繰り返す、この場合、全個体群をG418及び $3 \times 10^{-8}\text{M}$  MTXを含有する培地で選択した。これは耐性コロニーのかなり大きいブールを生じ、これを続いてブールして再び $6 \times 10^{-7}\text{M}$ 、その後 $3 \times 10^{-6}\text{M}$ の濃度のMTXを用いて2回増幅させた。この工程において、細胞を希釈クローニングし、カムバス1Hのレベルでスクリーニングした。単離した2つの最も高生産の細胞株は $100 \sim 150 \mu\text{g}/\text{ml}$ のレベルまで抗体を生産することができ、これらを4F11及び5E10と名付けた。

セット(MTX)の含まれていないWCM4培地中に $5 \times 10^4/\text{ml}$ の濃度で懸濁した。3つの $25 \text{ cm}^2$  フラスコに10mlの細胞懸濁液及びヒポキサンチン(H)、チミジン(T)又はHTを供給した。これらのフラスコを $5\% \text{ CO}_2$  インキュベーターで $36.5^\circ\text{C}$ でインキュベートした。

6日後、フラスコの内容物をブールし、MTXを添加した、ベプトン及びPEGの含まれない等量の培地を添加し、 $75 \text{ cm}^2$  フラスコに移した。

これらの細胞をテクネスピナー(Techne spinner)にまき、 $40 \text{ rpm}$ で攪拌しながら $36.5^\circ\text{C}$ でインキュベートした。細胞は5か月以上に渡って無血清で増殖し続け、細胞は適応期間が必要であるにもかかわらず、増殖速度及び生存性が改良された。群の倍加時間は約7週間に渡って計算すると73.1時間であった。これは次の20日間には47.4時間に減少し、その後安定した。抗体の分泌は $60 \mu\text{g}/\text{ml}$ のレベルのまま高く維持された。これらの細胞の遺伝子コピー数はノーザンブロット解析を用いたバンドの強度によって減少しないことが分かった。

発酵槽においてはこれらの細胞は $70 \mu\text{g}/\text{ml}$ の抗体を生産し、定期的に $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上のレベルまで達した。これらの細胞はC1H 3D11<sup>8</sup> 44と名付けた。

## WCM4培地

BSA、トランスフェリン及びレシチンを排除するために変形されたIscoves DMEM(Iscoves N and Melch

特表平5-504579 (8)

er (1978), J. Exp. Med. 1, 47, 923)。

+ 5ml/97t <sub>h</sub>	200mM L グルタミン
+ 50mg/97t <sub>h</sub>	L プロリン
+ 50mg/97t <sub>h</sub>	L トレオニン
+ 50mg/97t <sub>h</sub>	L メチオニン
+ 50mg/97t <sub>h</sub>	L シスチン
+ 50mg/97t <sub>h</sub>	L チロシン
+ 25mg/97t <sub>h</sub>	アスコルビン酸
+ 0.062mg/97t <sub>h</sub>	ビタミンB6
+ 1.36mg/97t <sub>h</sub>	ビタミンB12
+ 0.2mg/97t <sub>h</sub>	リボ酸
+ 0.088mg/97t <sub>h</sub>	リノール酸メチル
+ 1μM	メトトレキサート
+ 1mg/97t <sub>h</sub>	FeSO <sub>4</sub>
+ 1mg/97t <sub>h</sub>	ZnSO <sub>4</sub>
+ 0.0025mg/97t <sub>h</sub>	CuSO <sub>4</sub>
+ 5mg/97t <sub>h</sub>	組み換えインシュリン (Nucellia)
+ 50,000IU/97t <sub>h</sub>	ポリミキシン (polymyxin)
+ 20,000IU/97t <sub>h</sub>	ネオマイシン
+ 0.16mg/97t <sub>h</sub>	ブトレッシン (putrescine)-2HCl

無血清において2か月以上に渡って増殖した、前工程からのC1H 3D11<sup>+</sup>44細胞を、70rpmで回転するス

+ 50mg/97t <sub>h</sub>	L チロシン
+ 25mg/97t <sub>h</sub>	アスコルビン酸
+ 0.062mg/97t <sub>h</sub>	ビタミンB6
+ 1.36mg/97t <sub>h</sub>	ビタミンB12
+ 2mg/97t <sub>h</sub>	クエン酸第二鉄
+ 1mg/97t <sub>h</sub>	硫酸亜鉛
+ 0.0025mg/97t <sub>h</sub>	硫酸銅
+ 50,000IU/97t <sub>h</sub>	ポリミキシン
+ 20,000IU/97t <sub>h</sub>	ネオマイシン
+ 3μl/97t <sub>h</sub>	エタノールアミン
+ 0.16mg/97t <sub>h</sub>	ブトレッシン
+ 5mg/97t <sub>h</sub>	組み換えインシュリン (Nucellia)

WCM4及びWCM5中のすべての構成成分は商業的に入手可能である。

### 例3

#### カムバス-1H (G Dev-95) の精製

##### 材料及び方法

用いられた精製方法は3つのカラムを介したクロマトグラフィーを基礎としている。用いられたゲルは7.85mlプロテインAセファロース4ファーストフロー、ファーマシアコードNo. 17-0974-04 (10cm×1cm) ; 7.85ml S セファロースファーストフロー陽イオン交換体、ファーマシアコードNo. 17-0511-01 (10cm×1cm) ; 120ml スーパーデックス200

ステンレススチール製の角度のあるパドルの付いたSG11リットル発酵槽へ移した。温度を37℃に、dO<sub>2</sub>を10%に、pHを7〜7.2にセットした。発酵槽に0日目に、0.1%ポリエチレングリコール (PEG) 10,000及び0.25%大豆ベプトンを含むWCM4培地中に、0.22×10<sup>6</sup>細胞/mlの細胞をまき、上部にO<sub>2</sub>を供給した。新鮮な培地を用いて毎日細胞を継代し、分割速度は1〜2及び1〜4の間であった。

33日目に上部ガス供給を、細胞に、より物理障害を与えられと思われるディープスパーキング (deep sparging) にかえた。

50日目に前記WCM5 (下記表参照) をWCM4の代わりにベプトン及びPEGと共に用いた。

53日目にPEGを0.1%プルロニック (pluronic) F68と交換した。発酵槽中で、結果として達成された増殖及び抗体レベルは100μg/ml以上であった。

#### WCM5培地

BSA、トランスフェリン及びレシチンを排除するために変形されたIscoves DMEM

+ 5ml/97t <sub>h</sub>	200mM L グルタミン
+ 50mg/97t <sub>h</sub>	L プロリン
+ 50mg/97t <sub>h</sub>	L トレオニン
+ 50mg/97t <sub>h</sub>	L メチオニン
+ 50mg/97t <sub>h</sub>	L シスチン

サイズ排除媒体、ファーマシアコードNo. 17-1046-01 (60cm×1.6cm) である。各カラムは0.2μmゲルマンアクロ無菌フィルターによって保護されている。

#### 装置及び溶液の調製

プロテインAカラムシステムのハードウェアを1N NaOHを通して洗浄し、24時間この溶液中に放置し、エンドトキシンを除去した。ゲルはその後ファーマシアC10/20カラム中に詰め、20%エタノール中2%グルコン酸ヒビテンで消毒した。S セファロース及びスーパーデックス200ゲルは、製造者によると、両者とも1N NaOH中で長期間安定であるとされているので、これらのゲルを、カラム (それぞれファーマシアC10/20及びC16/100カラム) に詰め、1N NaOHを通して洗浄し、24時間この溶液中に放置してエンドトキシンを除去し、カラムシステムを消毒した。

カラムの操作及び消毒のための溶液は無バイロジェン蒸留水を用いて製造され、0.2μmのミリポアミリパック100フィルターを通して無菌濾過された。全溶液サンプルはLAL試験によってエンドトキシンについてアッセイされた後、その値の低いもののみが用いられた。

#### カラム操作

##### プロテインAセファロース4ファーストフローゲル

カムバス1H抗体を含む例1の組織培養培地を供給し、Sealkleen housingの0.2μmの無菌PALLposidyneSLK7002NfZPフィルター



を通して濾過した。プロテインAカラムシステムを消毒するために用いた20%エタノール中2%グルコン酸ヒペチンを蒸留水で除去し、システムをトリス緩衝生理食塩水pH7.5 (TBS) で平衡化した。プロテインAカラムには、その後1.75リットルの粗カムバス1H (71.4mg) を300cm/時間 (235ml/時間) の流率で、20℃±5℃の温度でかけた。結合していない物質を、5ベッド容積 (39.25ml) のTBS (pH7.5) を用いて、同じ流率で洗い流した。プロテインAゲルは、室温で24時間未満、0.1Mクエン酸 (pH3.0) を用いて300cm/時間で溶出させた。溶出プロファイルをファーマシアUV1シングルパスモニターを用いてA280nmで監視し、蛋白質のピークを単離した。溶出ピークの容積は18.9mlであり、この1mlを取り出し、下記のようにELISAによりカムバス1Hについてアッセイした。

#### S. セファロースファーストフロウゲル

1N NaOHを、20mM Hepes pH7.5を用いて、カラム洗浄液がpH7.5になるまでS. セファロースカラムシステムから洗い出した。残りのプロテインAカラム溶出液17.9mlを、300cm/時間 (235ml/時間) の流率でカラムにかけた。結合していない物質を7ベッド容積 (55ml) の20mM Hepes (pH7.5) を用いて同じ流率でカラムシステムから洗い流した。S. セファロースゲルを、1溶出工程で、20mM Hepes (pH7.5) 中0.2M NaClを300cm/時間の

流率で用いて溶出させた。溶出ピークを、A280nm (2mmパス長0.5A.U.F.S) でのファーマシアUV1モニターを用いたトレースによって回収した。溶出液の回収は約20%の偏向で始まり、トレースが70%の偏向に傾くまで続けられた。溶出容積は10mlであり、この1mlを下記のELISAによるカムバス1Hについてのアッセイのためにサンプル化した。

#### スーパーデックス200ゲル

1N NaOHを、PBS (pH7.2) を用いて、カラムの洗浄液がpH7.2になるまでスーパーデックスカラムシステムから洗い流した。残りのSセファロース溶出液9mlを、シリンジを用いてミリポア ミレックスGVフィルターを介してスーパーデックスカラムにかけ、フィルターを2mlのPBS (pH7.2) で洗浄した。PBS (pH7.2) を用いて、カラムを30cm/時間 (60ml/時間) で展開させた。ファーマシアUV1モニターを用い、A280nmでサイズ排除ピークを監視した。このピーク溶出フラクションを、モニターピークから凝集ピークを分離するために取り出した。モニターピークフラクションは17.6mlであった。

#### 酵素標識免疫吸着測定法 (ELISA)

これは、免疫的に精製されたヤギ抗血清から作製された抗ヒトIgGを、捕獲層として固相に接着させた標準的なサンドイッチ酵素免疫測定法 (参照) である。捕獲された抗原 (カムバス1H 1g) の検出は、ペルオキシダーゼで標識

されたヤギ抗ヒトIgGによって達成される。アッセイは、カゼイン及び加水分解されたゼラチンを含有する緩衝液で希釈されたカムバス1Hのサンプルを用いた逐次的なものである。37℃の温度で1時間30分のインキュベーションが行われた。3', 3', 5', 5' テトラメチルベンジジン (TMB) クロモゲン (chromagen) 及び加酸化水素基質を、結合したペルオキシダーゼを検出するために添加する。450nmの光学濃度を測定し、精製されたカムバス1Hの3.9ng~250ngの範囲の既知の標準濃度曲線から、カムバス1H濃度を読み取った。

#### 精製されたカムバス1Hの試験

1.35 (光学的に1.32) の吸光係数 ( $E_{1\%}^{1cm}$ ) 及びHPLCサイズ排除カラムにより凝集含有量について試験されたサンプルを用いて、モノマーピークの蛋白質含有量をA280nmで概算した。残りの物質をミリポア ミレックスGVフィルター (0.2μm孔サイズ) を通して無菌濾過し、29の0.5mlアリコートが無菌サルステッド管中に入れた。大部分のサンプルチューブは4℃で保存したが、6管は-70℃で保存した。4℃で保存からのサンプルを後述の例で詳述するアッセイに供した。

#### 結果及び議論

カムバスELISAの結果を下記表に示す。

サンプル	ELISA による力価	カムバス1H			
		バルク容積 (ml)	バルク中の C18の 量	次のカラムに 移行された C18の量	% 回収/カラム
粗精物	40.8μg/ml	1750	71.4	71.4	—
プロテインA 溶出液	4.2μg/ml	18.9	79.4	75.2	111.2
Sセファロース 溶出液	6.4μg/ml	10.0	64.0	57.6	85.0
スーパーデックス モノマー	2.5μg/ml	17.6	44.0	—	76.4

各カラムの回収率に基づいた3つのカラムシステムの全回収率は61.6%であった。

#### LAL試験によるエンドトキシン含有量

サンプル	Eu/ml
粗精物	1.25
スーパーデックスモノマーピーク	<0.625

#### 例4

通常のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を、平らな8~18%の濃度勾配のファーマシアエクセルゲル上で遂行した。結果を図2に示す。

#### 例5

逆相高速液体クロマトグラフィーによるカムバス1Hの特

性

濃度が2.4 mg/mlの、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)中の例3の生成物(G-Dev-95と名付けられた)のサンプル50  $\mu$ lを、以下の条件で逆相高速液体クロマトグラフィーにかけた。

カラム: PLRP-S1000<sup>®</sup> A (孔サイズ); 8  $\mu$ M (粒子サイズ) 15  $\times$  0.46 cm (ポリマーラボラトリーズ社、イギリス)。

移動相はギ酸/水/アセトニトリルシステムを用いた。

以下の勾配における成分A-ギ酸: 水(5:3)

	B - C H <sub>3</sub> C N							
% A	80	80	65	0	0	80	80	
% B	20	20	35	100	100	20	20	
時間 (分)	0	5	38	41	50	51	65	

カラムは、周囲温度における1 ml/分<sup>-1</sup>の流速で行われ、LDCスペクトロモニターD可変波長上のUV検出は、280 nmの波長において、0.1 a. u. f. sの感度で行われた。

#### 結果

図3から分かるように、上記システムを用いたカムバス1Hのクロマトグラフィーはシャープなシングルピークを示した。30分後に溶出するピークは移動相によるものである。

#### 例6

逆相高速液体クロマトグラフィー(RPHPLC)による、還元されかつカルボキシメチル化されたカムバス1Hの特性

B=水

C=アセトニトリル

% A	50	50	29.4	0	0	50	0
% B	35	35	20.6	0	0	35	35
% C	15	15	50	100	100	15	15
時間(分)	0	5	70	72	82	82.1	95

カラムは周囲温度において1 ml/分の流速で行われ、続いて280 nm a. u. f. sの波長でUV吸光度を調べた。

#### 結果

図4から分かるように、得られた物質は2つのピークに分かれ、これは重鎖及び軽鎖に一致した。

#### 例7

カムバス1H中の高分子量の組成を測定するための、高速サイズ排除クロマトグラフィーによるカムバス1Hの特性

リン酸緩衝生理食塩水中の例3の生成物(G-Dev-95)のサンプル50  $\mu$ l (濃度2.4 mg/ml)を、以下の条件で高速サイズ排除クロマトグラフィーにかけた。カラム-TSKゲルG3000 SWx1 30 cm  $\times$  0.78 cm i. d.

移動相-0.05M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>を用いてpH6.8に調整した0.1M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

流速-0.75 ml/分<sup>-1</sup>

カラムは24分間周囲温度で実行され、続いて280 nmの波長でUV吸光度を調べた。

#### 6a. カムバス1Hの還元及びカルボキシメチル化

まずジスルフィド結合を還元し、遊離チオール基をアルキル化することによって再形成されることを防ぐ標準的な還元及びカルボキシメチル化の手順を用いて、カムバス1Hをその組成である重鎖及び軽鎖にした。

濃度が2.4 mg/mlの、リン酸緩衝生理食塩水中の例3のカムバス1H G-Dev-95 1 mlを、0.5M トリス/HCl (pH9.0) 緩衝液中の8M 塩化グアニジウム1 ml及び同緩衝液中の7%ジチオトレイトール120  $\mu$ lに添加した。この混合液を37℃で2時間インキュベートした。

インキュベーションの後、0.5M トリス/HCl 緩衝液中の9%ヨード酢酸を添加し、この混合液を暗所に1時間放置した。

得られた還元されかつカルボキシメチル化された物質を、カムバス1H RCMと名付けた。

#### 6b. カムバス1HのRP HPLC特性

例6aの物質30  $\mu$ lを以下の条件で逆相高速液体クロマトグラフィーにかけた。

カラム: PLRP-S1000<sup>®</sup> A (孔サイズ); 8  $\mu$ M (粒子サイズ) 15  $\times$  0.46 cm (ポリマーラボラトリーズ社、イギリス)。

移動相に用いられたギ酸、水、及びアセトニトリルの濃度勾配を以下の表に示す。

A=ギ酸

例6aで還元されたカムバス1Hを用いた第二のサンプル50  $\mu$ lを、同じ方法で分析した。

結果: 図5の結果は、低レベルの凝集物を示す明確なシングルピークを示す。0.5~2.0%の間のレベルが一般的に達成される。図6の結果は、期待された比率で重鎖及び軽鎖と一致する2つのメインピークを示す。全浸透容積(約15~18分)におけるピークは試薬によるものである。

#### 機能的精製カムバス1Hに対する生物学的アッセイ

##### カムバス1Hについての補体溶解アッセイ

補体溶解アッセイは、特異的活性として表された抗体機能の尺度であり、既知の濃度の抗-CDW52抗体の精製された製剤が所定数の細胞に結合し、細胞を溶解する能力によって測定される。

アッセイは、細胞表面にカムバス抗原を発現しているKarpas 422細胞(B細胞非ホジキンリンパ腫細胞株から確立された-Dyer et al (1990) Blood, 75:704-714)を用いて遂行された。1.2  $\times$  10<sup>7</sup>個の細胞を、600  $\mu$ Ciの<sup>51</sup>Cr (クロム酸ナトリウム)の存在下で、CO<sub>2</sub>インキュベーターで37℃で2時間インキュベートすることによって放射能標識を行った。

培地中(総容積23.5 ml)の標識された細胞5.3 mlを12.5 mlの正常ヒト血清に添加し、混合物150  $\mu$ lをビレットでマイクロタイプレートにウェルに入れた。3つの精製工程からの最終的な溶出液のサンプル50  $\mu$ lを細胞と混合し、4℃で30分及び引き続いて37℃で90分

間インキュベートした。培養物を2000rpmで5分遠心し、細胞上清100μlの放射能活性をガンマカウンターでカウントした。キロユニット/mlの補体溶解活性を参照製剤(1000ユニット/ml)の標準曲線から計算した。

結果を表3に示す。

最終的な溶出液サンプル50μl中のカムバス1Hの濃度は、分光光度計で280nmで測定したPBS(pH7.2)中のサンプルを用いて評価される。結果は表3にmg/ml単位の光学濃度として示す。

このデータからキロユニット/mgの特異活性を

$$\frac{KU/ml}{OD}$$

の式を用いて決定することができる。

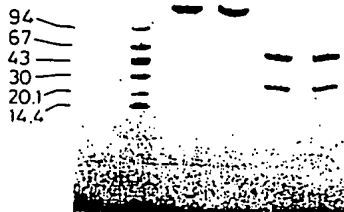
表3

サンプル	補体溶解	蛋白質濃度	特異活性
	キロユニット/ml	mg/ml	キロユニット
A	11.2	11.1	1.0
B	14.8	14.2	1.0
C	13.7	13.6	1.0

結果は、カムバス1Hの精製された製剤が機能的であることを示している。

Fig. 2

KD. MWM NR NR R R



GDEV-95

MWM- 分子量マーカー  
NR- 非還元  
N- 還元

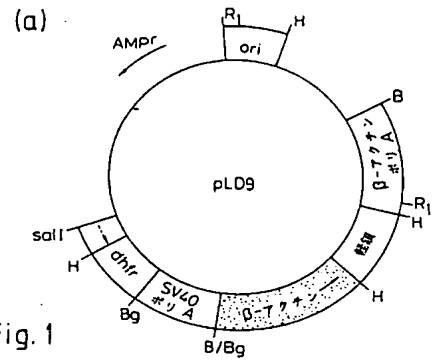


Fig. 1

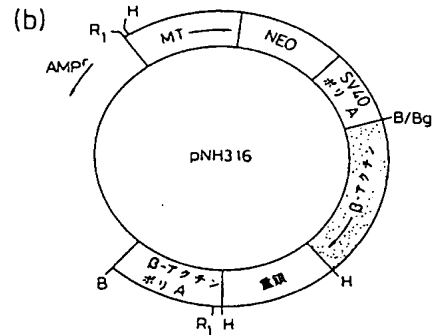


Fig. 3

逆 相		/ 非還元	
分析 0.1W			
サンプル	B007	1457 20069B	14:57 20/6/90
方法	RP CPH		
保持時間	ピーク HT	ピーク 面積	%面積
1.82	22.76	107.02	2.050
2.27	3.24	137.40	2.632
3.40	2.09	153.14	2.934
14.53	232.98	3867.36	74.088
24.05	.11	0.11	.155
38.32	.39	42.65	.817
47.50	3.67	904.28	17.324
		5219.96	
			ピーク NO.
			開始
			終了
			1.75B
			2.00B
			3.08B
			4.13B
			15.70B
			24.25V
			39.70B
			49.98B

プロテティングファクター-4022.072 -102.000

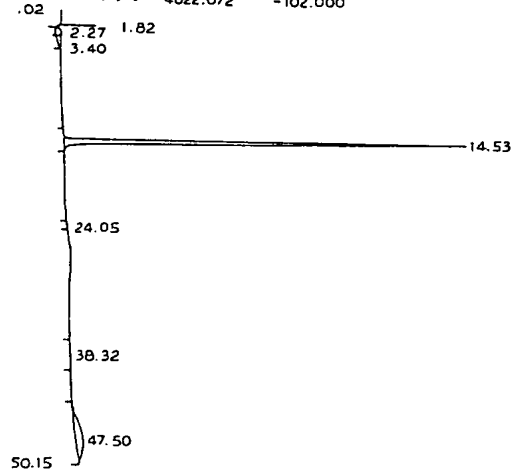


Fig. 4

逆相 / 還元							
分析 6.1W		1059 200690		10:59 20/6/90			
サンプル B005							
方法 : RP (RCM) CPH							
保持時間	ピーク HT	ピーク 面積	%面積	ピーク NO.	ピーク 開始	ピーク 終了	
23.52	.15	7.00	.590	1	22.08B	24.20B	
26.90	3.96	229.71	19.370	2	25.10B	29.88B	
36.83	13.81	643.29	54.245	3	35.43B	39.27V	
39.62	.15	8.27	.697	4	39.27V	41.16B	
51.17	.59	51.71	4.360	5	50.35B	53.40B	
67.65	1.01	171.79	14.486	6	63.65V	67.75V	
68.03	.91	74.13	6.251	7	67.75V	69.98B	
		1185.90					

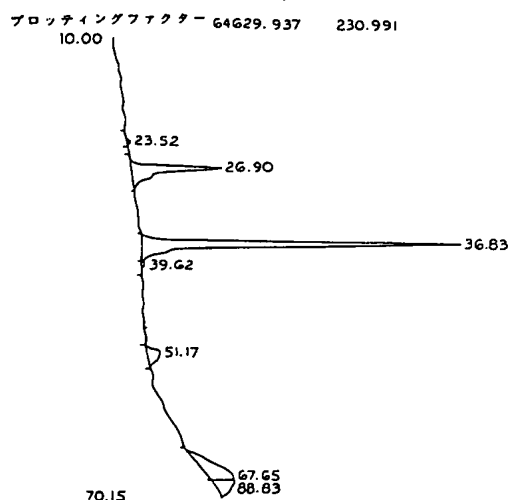


Fig. 5

サイズ排除 / 非還元							
分析 6.1W		1345-200690		13:45 20/6/90			
サンプル D203							
方法 : CPH SEC G-DCV 95							
保持時間	ピーク HT	ピーク 面積	%面積	ピーク NO.	ピーク 開始	ピーク 終了	
10.32	264.03	7385.00D	100.000	1	9.42B	14.13B	
		7385.00					

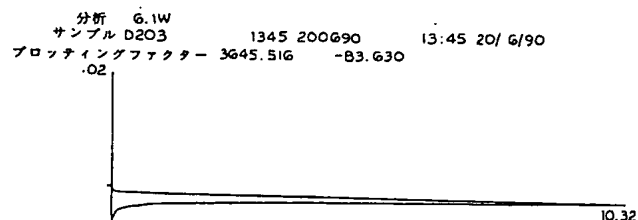
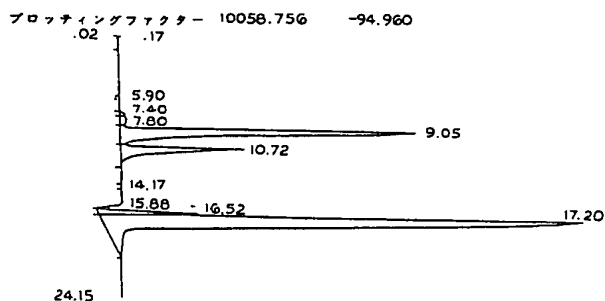


Fig. 6

サイズ排除 / 還元							
分析 6.1W		1318-190690		13:18 19/6/90			
サンプル C104							
方法 : SEC RCM CPH							
保持時間	ピーク HT	ピーク 面積	%面積	ピーク NO.	ピーク 開始	ピーク 終了	
5.90	.79	11.14	.139	1	.08B	1.38B	
7.48	1.08	15.07	.001	2	5.75B	6.00B	
7.60	1.39	59.61	.191	3	7.13B	7.55V	
9.05	57.07	1838.27	.745	4	7.55V	8.43V	
10.72	23.52	876.32	22.965	5	8.43V	10.23V	
14.17	.00	.09	10.948	6	10.23V	12.33B	
15.88	1.37	15.60	.001	7	13.88B	14.32B	
16.52	19.18	310.43	.195	8	15.80B	16.05B	
17.20	94.47	4877.93	3.878	9	16.10B	16.63V	
		8004.72	60.938	10	16.63V	20.60B	



#### 要約書

サイズ排除クロマトグラフィーにおいて、非還元状態でシングルピーク、及び還元状態で2つのメジャーピークを示す抗-CDW52抗体の精製された製剤である。

この製剤は、また通常のSDS-PAGEにおいて、非還元サンプルを用いた場合に1つのメインバンド、還元サンプルを用いた場合に2つのメインバンドを示す。

更に、この製剤は逆相HPLCにおいて、非還元状態でシングルピーク、還元状態で2つのメジャーピークを示す。また抗-CDW52抗体の調製方法、及びこの精製された製剤を含有する処方及びその使用である。

平成5年3月5日

特許庁長官 麻 生 渡 殿

## 1. 事件の表示

**PCT/GB91/01816**

特願平 3 - 516509号

## 2. 発明の名称

精製イムノグロブリン

### 3. 補正をする者

**事件との関係**

名称 ザ・ウエルカム・ファウンダー・ション・リミテッド

#### 4. 代理人

住所 東京都千代田区霞が関3丁目7番2号

節榮内外國特許事務所内

〒 100 電話03(3502)3181 (大代表)

氏名 (5847) 井理士 鈴江武彦

### 5. 補正命令の日付

平成5年2月16日

## 6. 補正の対象

特許法第184条の5第1項の規定による書面(特許出願人の代表者)、  
図面翻訳文の浄書、委任状及びその訳文

7. 補正の内容 別紙の通り

なお、図面翻訳文の浄書の内容に変更はない。



特表平5-504579 (13)

國際調查報告

PCT/GB 91/01816

1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER According to International Patent Classification (IPC) or to any other formal Classification and IFC: Int.Cl. 5 C12P21/08; C07K3/28; A61K39/395		
2. FIELDS SEARCHED Bibliographic Classification Searched? Classification System: C07K International Patent Classification Searched? Classification System:		
Documents Searched other than Bibliographic Classification in the Extent that such Documents are Indicated in the Fields Searched?		
3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <sup>1)</sup>		
Category <sup>2)</sup> X Y Y	Class of Document, <sup>3)</sup> and date(s), where appropriate, of the relevant patent(s) <sup>4)</sup> THE LANCET 17 December 1988, LONDON, GB pages 1394 - 1399; G. HALE ET AL.: 'Remission induction in non-Hodgkin lymphoma with reshaped human monoclonal antibody CAMPATH-1M.' cited in the application see page 1395, left column, line 28 - right column, line 11 --- BIOPHARM vol. 2, no. 6, June 1989, EUGENE, OREGON, USA pages 34 - 45; S. DUFFY ET AL.: 'Recovery of therapeutic-grade antibodies: Protein A and ion-exchange chromatography.' see the whole document --- ---	Reference to Class No. <sup>5)</sup> 4-7, 14-16 --- 1-3, 8-13 1-3, 8-13
* Special categories of cited documents: <sup>1)</sup> "A" means: containing the subject-matter of the invention to which the application relates or to be taken into consideration in the examination of the application "B" means: not published on or after the international filing date "C" means: which may show details on priority documents or might be cited in evaluating the prior art state of the invention or of other related subject (or specific) "D" means: published but not available for examination or other uses "E" means: published prior to the international filing date but have made the priority not claimed		"1" New document published after the international filing date of priority date and not to be studied with the application and not to be taken into the priority or theory underlying the application "2" Document of particular importance the dated invention must be considered novel or obvious in connection to known or known art "3" Document of particular importance the dated invention must be considered to be obvious in connection to known or known art and the date of invention must not be more than one year from the date of invention "4" Document of particular importance the dated invention must be considered to be obvious in connection to known or known art and the date of invention must not be more than one year from the date of invention "5" Document of particular importance the dated invention must be considered to be obvious in connection to known or known art and the date of invention must not be more than one year from the date of invention
IV. CERTIFICATION Date of the Actual Completion of the International Search: 27 January 1992 Date of Mailing of this International Search Report: 0 6. 02 92 International Searching Agency: EUROPEAN PATENT OFFICE Signature of Authorized Officer: MOOLIJ F.J.M.		

DOI: 10.1002/for

PCT/G8 91/01816

B. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Character of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Reference to Class No.
A	<p>JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY vol. 9, no. 2, January 1989, AMSTERDAM, NL pages 83 - 106; J. KENNEDY ET AL.: 'The use of HPLC in biotechnology. Review.' see page 101, line 24 - line 42</p> <p>—</p>	1-3, 8-13
A	<p>WO,A,8 905 157 (INVITRON CORPORATION) 15 June 1989 see the whole document</p> <p>—</p>	1, 8-13

國際調查報告

CG 9101816  
SA 52295

This annex lists the papers foundly mentioned relating to the patient documents cited in the above-mentioned international search report. The annexes are as mentioned in the European Patent Office EPO file as The European Patent Office is in no way liable for those particulars which are merely given for the purpose of information. 27/01/92

Patent document used in priority report	Publication date	Patent family number(s)	Publication date
WO-A-8905157	15-06-89	AU-A- 2819289	05-07-89

For more details about this season, see *Official Journal of the European Patent Office*, No. 12/95.

## 第1頁の続き

⑥Int. Cl. <sup>9</sup>			識別記号	庁内整理番号
A	61	K 39/395	D	8413-4C
			M	8413-4C
C	07	K 3/20		7731-4H
C	12	P 21/08		8214-4B
//	C	12 N 15/13		
(	C	12 P 21/08		
	C	12 R 1:91)		

⑦発明者 アレン、ジェオフリー

イギリス国、ビーアール3・3ビーエス、ケント、ベツケンハム、  
ラングレイ・コート (番地なし)